

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: S200126019

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

不同年份对虾白斑综合症病毒基因组差异
的芯片分析

Microarray Analysis of Genomic Variations of White Spot
Syndrome Virus in Different Years

吴常嵩

指导教师姓名: 杨 丰 研究员

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 27 日

论文答辩时间: 2006 年 月 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：吴常嵩

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

| | |
|---------------------------|----|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 2 |
| 1. 前言 | 3 |
| 1.1 对虾白斑综合症病毒 | 3 |
| 1.2 DNA 芯片技术 | 5 |
| 1.2.1 DNA 芯片技术的概念和原理 | 5 |
| 1.2.2 DNA 芯片技术产生的背景和发展现状 | 6 |
| 1.2.3 DNA 芯片的技术要点 | 6 |
| 1.2.3.1 DNA 芯片的制备 | 6 |
| 1.2.3.2 DNA 芯片的使用方法 | 7 |
| 1.2.4 DNA 芯片的应用 | 11 |
| 1.2.4.1 基因表达分析和新基因发现 | 12 |
| 1.2.4.2 基因诊断与基因药物的设计 | 12 |
| 1.2.4.3 蛋白组学方面的应用 | 12 |
| 1.2.4.4 基因组文库作图 | 13 |
| 1.2.4.5 单核苷酸多态性 | 13 |
| 1.2.4.6 药物筛选 | 13 |
| 1.2.4.7 测序 | 13 |
| 1.2.5 DNA 芯片技术的展望 | 13 |
| 2. 材料与方法 | 14 |
| 2.1 材料 | 14 |
| 2.2 常规实验试剂与配制 | 14 |
| 2.3 DNA 芯片的构建 | 17 |
| 2.3.1 对虾白斑综合症病毒基因片段的扩增 | 17 |
| 2.3.2 膜芯片的点样制备 | 17 |
| 2.4 cDNA 探针的准备 | 18 |
| 2.4.1 感染阳性螯虾总 RNA 提取与质量鉴定 | 18 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.4.2 总 mRNA 的纯化····· | 18 |
| 2.4.3 Bio-11-dUTP 逆转录标记 cDNA····· | 19 |
| 2.5 基因组 DNA 探针的准备····· | 20 |
| 2.5.1 纯 WSSV DNA 的提取····· | 20 |
| 2.5.2 DIG-dUTP 标记基因组 DNA····· | 21 |
| 2.6 标记探针与 DNA 芯片的杂交····· | 21 |
| 2.7 DNA 芯片扫描····· | 21 |
| 2.8 图像标准化与数据分析····· | 21 |
| 2.9 RT-PCR 和 PCR 对芯片结果的验证····· | 22 |
| 3. 结果与讨论····· | 22 |
| 3.1 WSSV DNA 芯片的制备····· | 22 |
| 3.2 总 RNA 的提取····· | 23 |
| 3.3 mRNA 的分离纯化和 cDNA 的逆转录标记····· | 24 |
| 3.4 DNA 芯片扫描结果····· | 24 |
| 3.5 WSSV DNA 芯片数据分析结果····· | 26 |
| 参考文献····· | 32 |
| 附录····· | 45 |
| 致谢····· | 50 |

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chinese abstract | 1 |
| English abstract | 2 |
| 1. Introduction | 3 |
| 1.1 White spot syndrome virus | 3 |
| 1.2 DNA microarray technology | 5 |
| 1.2.1 The concept and basic principles of DNA microarray technology | 5 |
| 1.2.2 Background and current development of DNA microarray technology | 6 |
| 1.2.3 Keys of DNA microarray technology | 6 |
| 1.2.3.1 Preparation of DNA microarray | 6 |
| 1.2.3.2 Use of DNA microarray | 7 |
| 1.2.4 Application of DNA microarray | 11 |
| 1.2.4.1 Analysis of gene expression and discovery of new genes | 12 |
| 1.2.4.2 Gene diagnosis and design of gene medicine | 12 |
| 1.2.4.3 Application in proteome analysis | 12 |
| 1.2.4.4 Map of genome library | 13 |
| 1.2.4.5 Single Nucleotide Polymorphism | 13 |
| 1.2.4.6 Screening the medicine | 13 |
| 1.2.4.7 Sequencing | 13 |
| 1.2.5 View of DNA microarray technology | 13 |
| 2. Materials and Methods | 14 |
| 2.1 Materials | 14 |

| | |
|---|----|
| 2.2 Routine reagent | 14 |
| 2.3 Construction of DNA microarray | 17 |
| 2.3.1 Amplification of WSSV gene | 17 |
| 2.3.2 DNA microarray Spotting | 17 |
| 2.4 Preparation of cDNA probe | 18 |
| 2.4.1 Total RNA isolation and its quality control | 18 |
| 2.4.2 Total mRNA purification | 18 |
| 2.4.3 mRNA labeled with Bio-11-dUTP | 19 |
| 2.5 Preparation of genome DNA probe | 20 |
| 2.5.1 Isolation of pure WSSV DNA | 20 |
| 2.5.2 Genome DNA labeled with DIG-dUTP | 21 |
| 2.6 Hybridization of labeled probes and DNA microarray | 21 |
| 2.7 Scanning of DNA microarray | 21 |
| 2.8 Data normalization and analysis | 21 |
| 2.9 Validation of hybridization result with RT-PCR and PCR | 22 |
| 3. Results and discussion | 22 |
| 3.1 Preparation of WSSV DNA microarray | 22 |
| 3.2 Isolation of total RNA | 23 |
| 3.3 mRNA purification and cDNA labeled with Bio-11-dUTP | 24 |
| 3.4 Scanning results of DNA microarray | 24 |
| 3.5 Analysis results of WSSV DNA microarray data | 26 |
| Reference | 32 |

Supplement.....45

Acknowledgement.....50

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是对虾养殖业最主要的病原,它产生的病害给全世界对虾养殖业造成了很大的经济损失。该病毒具有广泛的宿主,包括许多甲壳类动物,并且能感染宿主的大部分组织,给病毒的防治研究带来困难。对 WSSV 进行全面并具有针对性的研究是解决病害的关键。在进行病毒功能基因组研究过程中,已经有文章报道大片段的基因缺失导致了该病毒毒力的减弱。基于 WSSV 以上的特点,我们收集了 1996 年、1998 年、2000 年和 2002 年的病毒样品,结合 DNA 芯片技术,开展了 WSSV 全基因组的图谱分析比较,试图研究近年来 WSSV 基因组的变化规律,为病毒变异的深入分析打下基础。

本文以生物素和地高辛标记的 Microarray 技术对 WSSV 近年来的转录表达规律进行研究分析。根据全基因组序列,设计了 190 对引物覆盖绝大多数可预测的开放读框(ORF),扩增相应的 WSSV 基因片段,用点样仪在尼龙膜上进行点样,制备成为 DNA 芯片。将 1996 年、1998 年、2000 年和 2002 年收集的感染对虾分别提取病毒悬液用以感染健康的螯虾。提取这 4 种病毒株的 mRNA 和总 DNA 分别用生物素和地高辛标记后与 DNA 芯片杂交。实验表明绝大多数可预测的 WSSV ORF 在感染的螯虾体内进行了转录表达。1996 年病毒株有着全长基因组 DNA,1998 年和 2000 年病毒株缺失了 wsv493 和 wsv495,2002 年病毒株另外缺失了 wsv479、wsv482、wsv489。分别运用 RT-PCR 和 PCR 验证了两组 DNA 芯片杂交结果的可靠性,证实了 WSSV 大陆株存在一个不稳定的区域,并以缺失的方式随着时间进行遗传变异。

关键词:对虾白斑综合症病毒;DNA 芯片;缺失

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is the heaviest pathogen to shrimp culture, causing catastrophic economic losses in cultured penaeid shrimp worldwide. Prevention and inhibition of WSSV can be difficult due to its extremely virulence and a wide host range including most of aquatic crustacean and targets various tissues. The pertinent study for import genes may be the most important for WSSV study. To obtain variety information of gene transcription, we collected the WSSV isolates in 1996, 1998, 2000 and 2002 respectively, and studied the transcriptional profile of WSSV with DNA microarray.

With the capability and availability of the entire sequence of WSSV genome, 190 primer pairs were synthesized to amplify each potential WSSV ORF. So PCR products by using the complete set of primer pairs were expected to cover the entire WSSV genome. The PCR amplified products were spotted onto the nylon membrane to generate arrays using SpotBot Personal Microarrayer system. WSSV-free crayfishes were infected with the virus inoculum prepared from four WSSV isolates prepared in 1996, 1998, 2000 and 2002, respectively. mRNA and genomic DNA of WSSV were isolated and labeled with Bio-11-dUTP and DIG-11-dUTP respectively. Each labeled probe was hybridized to a microarray. The results indicated the majority of the genes were expressed. Genetic analysis revealed that the 1996 WSSV isolate has full length genomic DNA, the 1998 and 2000 WSSV isolates having the deletion in wsv493 and wsv495, and the 2002 WSSV isolate additionally has the deletion in wsv479, wsv482 and wsv489. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR was performed to validate the microarray results. The results confirm the exact position of the unstable region in WSSV and indicate that WSSV in China is in a phase of time-dependent genetic evolution with a deletion pattern.

Key words: White spot syndrome Virus (WSSV); Microarray; Deletion

1. 前言

1.1 对虾白斑综合症病毒

对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV), 于 20 世纪 90 年代初首先在中国台北发现, 是 1993 年以来导致我国沿海人工养殖对虾爆发流行病大规模频繁发生的主要病毒病原。随后在泰国、印度尼西亚、日本、韩国等亚洲及太平洋海岸国家相继也有类似的报道。发病对虾典型表征为甲壳白斑、空胃、体色发红、甲壳易剥离。不粘表皮, 该病的病原致病性强, 感染对虾在 3—7 天时间内死亡率可达到 90%-100%^[1,2]。自从暴发对虾流行病以来, 众多的研究者通过病虾的组织切片或病毒提取物的电镜观察均表明对虾白斑综合症病毒的病毒粒子外形为短杆状, 大小约 250-300nm×75-100nm, 直径约 90—100nm, 一端略平带有轻微凹陷, 另一端略细, 略细端有一乳头状结构, 大小约 40nm×50nm, 无包涵体; 病毒粒子的最外层是由 2 层单位膜组成的囊膜, 两层膜之间有较宽阔的间隙; 紧接囊膜向内是核衣壳, 病毒的核衣壳结构为螺旋排列的亚单位形成的圆柱体, 螺旋与衣壳长轴垂直, 螺距 30nm, 衣壳螺旋由籽粒构成, 每个籽粒单位由 2 个边缘颗粒和 1 个中间颗粒组成, 核酸存在于衣壳中; 病毒粒子可以存在于对虾的细胞核或者细胞质中, 但以细胞核中居多。在对虾白斑综合症病毒的病毒粒子一端的乳头状结构与昆虫核型多角体病毒及斑节对虾杆状病毒有相似之处, 这些结构可能与病毒对组织和细胞的识别以及病毒的吸附和侵入过程有关。对虾白斑综合症病毒的宿主范围广, 可以感染海水虾类、蟹类和淡水虾类^[3, 4]。这不仅给对虾白斑综合症病毒的防治带来很大的困难, 而且对于环境构成了潜在的威胁。

组织病理及组织切片的原位杂交研究揭示了对虾白斑综合症病毒的感染过程: 病毒通过口吸或鳃进入对虾体内。首先通过胞饮作用进入细胞, 在向核移动过程中, 核衣壳蛋白逐渐降解, 病毒 DNA 进入细胞核。接着, 病毒 DNA 在细胞核内复制和转录, 进行病毒的组装。病毒 DNA 首先出现在染色质的边缘, 引起细胞核增大, 病毒的形态形成起始于膜在核质中的再形成以及分割的、空长管的精密形成, 这些小管形成裸露的核衣壳, 然后膜包被核衣壳, 核蛋白通过开口端进入衣壳, 当核心形成后, 包膜(envelope)在开口端收缩, 形成成熟病毒粒子的顶端尾, 无包涵体的病毒粒子形成后, 病毒通过核膜和细胞膜, 细胞破坏后释

放出病毒粒子再感染其它细胞。病毒粒子的包装主要在细胞核内进行,有时也可在细胞质中进行^[5]。完整的对虾白斑综合症病毒粒子具有双层膜,在感染细胞中为自由的单粒,偶尔在同一包膜中有 2 个病毒粒子^[6]。表皮上皮是病毒侵染的主要组织之一,还可侵染连接组织、神经组织、肌肉组织、类淋巴组织、造血组织等,感染器官为胃、鳃、淋巴器官、触角腺、表皮上皮等^[7]。

80 年代后期开始,国外及台湾开展了大规模的对虾病害调查研究工作,我国大陆从 80 年代初期也开始了此项工作,但是均未报道过甲壳内出现白斑症状的对虾病毒,病症十分明显、典型,而且死亡率高,极易被检出,漏检的可能性几乎不存在。引起白斑病的对虾白斑综合症病毒在形态结构、组织病理以及基因组 DNA 等方面与杆状病毒和其他病毒都有很大不同。已知的分子生物学证据表明,对虾白斑综合症病毒不属于目前已知的任何病毒科,是一种新病毒。对虾白斑综合症病毒最近的分类地位为 *Nimaviridae* 单型科, *Whispovirus* 属的单一种。

研究显示,各地的 WSSV 在基因序列、蛋白构成等方面没有大的差异,电镜观察来自中国、印度、泰国、美国德州和南加州的对虾 WSSV 以及螯虾 WSSV 在形态上没有差异。Wang^[8]等对来自这些区域不同病毒株的纯病毒 DNA 用酶切和 southern Blot 杂交的方法鉴定分析表明不同的对虾 WSSV 之间没有差异,而与螯虾 WSSV 相比存在 2.8kb 的差异片断。SDS-PAGE 和 N-末端测序(12AA)表明,25 kDa (SWISS-PROT accession numbers P82004 即 wsv421, VP28),23 kDa (P82005,即 wsv311, VP26) 和 19 kDa (即 wsv414,VP19) 的结构蛋白均有发现,但螯虾 19 kDa 蛋白大于其它来源病毒,14.5 kDa (P82006 即 wsv214,VP15)的结构蛋白仅在四种来源的病毒中发现^[9-21]。这些说明了在不同物种宿主体内,WSSV 的蛋白表达存在一定的差异。目前有三家实验室完成了不同病毒株的测序工作,分别是中国大陆株,305107bp(AF332093)^[22],泰国株 292967bp(AF369029)^[23]台湾株 307287bp(AF440570)。Marks 等对三株病毒基因组序列比较研究发现,泰国病毒株和大陆病毒株与台湾病毒株相比,最大的差异在于在一个相同的区域分别缺失了 13kb 和 1kb 左右,另外就是有着一段可能是重组所导致的 750bp 序列^[24]。Lan 等在对大陆病毒株的整个基因组进行扩增研究时,发现病毒基因组存在高可变区,最大基因片段缺失达 8.1kb,其中缺失的基因可能与病毒的毒力有关^[25]。

WSSV 具有广泛的宿主, 包括许多水生甲壳类动物。由于目前野生和养殖的对虾受 WSSV 感染已相当普遍, 难以获得适合实验的材料, 且对虾不易在实验室条件下饲养, 又因为淡水螯虾 (*Procambarus clarkii*) 能被 WSSV 感染, 所以螯虾已被作为替代宿主用于研究工作, 并已从其血淋巴中纯化得到大量的病毒粒子^[26]。以螯虾作为感染宿主, 病毒呈现类似在对虾体内的病理学特征, 感染后导致 100% 死亡^[27]。组织化学观察和核酸原位杂交证明了 WSSV 的感染, 但是没有白斑形成^[28]。从感染螯虾中提取的病毒, 无论病毒的形态、大小, 分离的结构蛋白的数量、分子量、分子特征与对虾来源的病毒存在一致的特征^[29]。由于螯虾饲养极其容易, 排除了由于对虾饲养不当造成的实验误差, 因此本文将螯虾作为 WSSV 研究的实验材料。

1.2 DNA 芯片技术

随着科学技术的迅猛发展, 生命科学研究正由结构基因组时代逐渐转向功能基因组时代。到目前为止, 已有 600 多株病毒、100 多种细菌和真菌的全基因组被破译, 人类和多种动植物基因组计划也相继完成。现有的大量的基因组信息为研究不同基因在生命过程中所扮演的角色提供了可能。但是由于传统的技术已不能适应处理如此巨大信息的需要, 建立新型研究分析方法显得尤为迫切。被美国科学促进会列为 1998 年度自然科学领域十大进展之一的 DNA 芯片技术正是在这种需求下得到了飞速发展。DNA 芯片技术的诞生, 为全面、快速了解基因组信息必将起到推动作用。

1.2.1 DNA 芯片技术的概念和原理

DNA 芯片(DNA chip)有许多同义名词, 又称基因芯片(gene chip), DNA 微阵列(DNA microarray), DNA 微芯片(DNA microchip), DNA 阵列(DNA array)等, 但普遍地被称为 DNA chip 或 DNA microarray。虽然“基因芯片”(gene chip)这个词有时也用, 但是 GeneChip 是 Affymetrix 公司基因分析研究用的专利微矩阵, 它能够在一块上摆放多至 400000 个不同的寡核苷酸片段或 10000 个基因的每个基因的 40 个片段。DNA 芯片技术是指采用原位合成或合成后点样等方法, 将 DNA 片段以大规模阵列的形式有序地固化于载体(玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙或硝化纤维膜等)的表面, 然后与待测生物样品中的靶分子进行杂交。反应结果用化学荧光法、化学发光法、同位素法或酶标法显示, 通过精密的扫描仪或

电荷耦联摄影像机(CCD)等仪器对杂交信号进行生物遗传信息的快速、高效、并行分析。由于最初用硅芯片作固相支持物,且在制备过程中运用了计算机芯片的制备技术,所以称为 DNA 芯片技术。DNA 芯片技术的核心原理与 Southernblot 相同。但 Southernblot 是将待测样品固定于尼龙膜上,与一个特定的经标记的 DNA 探针杂交,每次只能对一个靶序列进行检测;而 DNA 芯片技术则是将大量的 DNA 探针固定于固相基质上,与待测的经标记的 DNA 样品杂交,只需一次实验,就可以对大量序列进行检测分析,具有高通量、并行、快速等特点,解决了传统核酸印迹杂交技术操作繁杂、自动化程度低、检测序列少、效率低的缺点,具有巨大的应用前景。

1.2.2 DNA 芯片技术产生的背景和发展现状

DNA 芯片的理论基础来源于 Ed southern 提出的杂交理论、杂交测序 (sequencing by hybridization, SBH)概念提出之后,美国 Affymetrix 公司于 20 世纪 90 年代初率先开展了 DNA 芯片的研究^[30],生产出了世界上第一块寡核苷酸芯片 1995 年,美国斯坦福大学 P.B.Brown 实验室研制成功了第一块以玻璃为载体的 DNA 芯片^[31]。1996 年, AFFYMETRIX 公司登陆纳斯达克随后世界许多国家和地区都开始进行 DNA 芯片的研制开发。1998 年美国正式启动 DNA 芯片计划,NIH、能源部等政府部门和斯坦福大学、麻省理工学院等均参加了该计划。2004 年,全球有超过 2000 家公司和实验室从事生物芯片相关研究和产业。众多 DNA 芯片生产企业纷纷加大了资金投入,已有一批商业化产品问世。目前, Affymetrix 公司作为业界的领头羊,每年投入巨资,并与众多大型制药企业签约合作,扩展对 DNA 芯片的研究。同时, Hyseq、Incyte、Nanogem 等一批新兴企业也加快步伐,积极运用新技术制造 DNA 芯片,极大地促进了 DNA 芯片研究的发展。近年,随着各种相关技术的进步, DNA 芯片技术的应用范围不断扩大,特别是在基因表现(gene expression)及基因诊断(gene diagnoses)方面有非常显著的成果。目前, DNA 芯片技术已成为“后基因组时代”基因功能分析研究的最重要技术之一。

1.2.3 DNA 芯片的技术要点

1.2.3.1 DNA 芯片的制备

- 固相支持物的选择

目前,常用于 DNA 芯片制作的固相支持物主要包括半导体硅片、普通玻璃片、尼龙膜、磁珠等基质。它们各有优缺点,可根据不同的用途及目的选择使用。用硅片制作的芯片,其 DNA 探针排列的密度高,在 1.28cm 芯片上,可达 40 万点阵,检测灵敏度高,但专一性较差。用玻璃片制作的芯片可用于双色荧光标记杂交,便于杂交信号检测,但其灵敏度低,而且对玻璃片的处理要求较高。尼龙膜可用同位素标记检测,灵敏度高,专一性好,但是 DNA 阵列的密度低。以磁珠为基质制作 DNA 芯片目前正在研究中,技术还不成熟。现在常用的是膜芯片和玻璃芯片。

● DNA 的制备及固化

膜芯片只能采用点样法进行制备。样品点样前需合成、纯化并定量。膜基质材料通常为带正电的尼龙膜、硝酸纤维素膜(含有特殊支架材料,增加柔韧性)等。核酸在中性溶液中带负电荷,与带正电荷的膜基质可牢固结合。点样 DNA 样品用前加入 0.4N 的 NaOH 或 DMSO 或使用一些试剂公司生产的点样缓冲液后用于点样。膜芯片点样后进行紫外交联后风干或直接高温烘干(120℃为半小时或于真空条件下 80℃为 2 小时)后备用。膜芯片可以根据需要剪裁为不同的大小。玻璃载体来源方便,具有专门的规格大小(25mm×76mm),易标准化。具有专门的扫描系统。采用发光检测方法,透射光和反射光均适合。玻璃载体的表面一般要用 N, N-二乙氧基氨基丙基三乙氧基硅烷做活化处理,使产生表面羟基,能够偶联核酸大分子。可以采用点接触法、喷墨法和光刻 DNA 合成法等制备玻璃芯片。由于 DNA 在玻璃载体上的扩散半径远小于膜芯片,相同面积可以容纳更多样品位点。

1.2.3.2 DNA 芯片的使用方法

● mRNA 的提取和标记

由于所使用的标记物不同,因而相应的探测方法也各具特色。大多数研究者使用荧光标记物,本实验使用生物素标记,联合抗生物素结合物检测 DNA 化学发光。如果采用尼龙膜作为固相支持物,直接以荧光标记的探针用于 DNA 芯片杂交将受到很大的限制,因为在尼龙膜上荧光标记信号信噪比较低^[32]。因而使用尼龙膜作为固相支持物的这些研究者大多是采用生物素标记的。本实验采用抗生蛋白链霉素(streptavidinalkalinephostase)结合物的方法,化学发光底物可选用鲁

米诺 (Lumino) 和 1,2 dioxetane 等, 相应的酶为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 和碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase) 等。生物素标记的样品与芯片杂交并清洗之后, 通过抗生物素与生物素结合, 将化学发光底物酶抗生物素结合物结合于杂交部位。随即将芯片置于化学发光底物 NBT/BCIP 中, 由于杂交部位含有化学发光底物酶可激活化学发光底物发光, 便可通过探测化学发光束得知芯片上分子杂交情况。曾有研究者使用传统的探测方法, 即 X 射线胶片直接曝光, 这种方法虽然简便, 但由于化学发光光强较弱, 因而不适合高密度的 DNA 芯片^[33]。因而许多学者将探测方法加以改进, 并取得较好的效果。

先提取总 RNA, 再从中分离纯化 mRNA。总 RNA 的提取方法可参考《分子克隆-实验指南》^[34]。现在常采用的方法有: (1) Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform, 即 AGTPC^[35]法。AGTPC 法操作烦琐, 但提取效果佳, 重复性好; (2) TRIzol^[36,37,38,39,40]法, 是 AGTPC 的商业化改进, 但是各家商品质量差别较大; (3) 纤维素柱层析法^[41,42,43], 往往对 DNA 的去除效果较差等。检测是否存在 DNA 污染, 可以采用以提取的 RNA 为模板, PCR 扩增基因组的看家基因或以空白芯片杂交检验。以 Oligo (dT) 偶联的磁珠、纤维素等是 mRNA 提取最常用的方法。一些著名厂家如 Promega, QIAGEN 等产品均取得满意的效果^[44,45,46,47,48,49]。RNA 质量的检验有以下几个标准, (1) RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值介于 1.8-2.0 之间; (2) 琼脂糖凝胶电泳显示条带清晰、无降解; (3) 合成的 cDNA 平均长度应大于 1000bp (指绝大多数生物); (4) Northern blot 实验 100ng 的 mRNA 应检测到看家基因。

● 标记样品与 DNA 芯片杂交

DNA 芯片技术是根据 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋原理而发展的核酸链间分子杂交的技术。杂交反应是靶标样品核酸和探针之间的选择性反应。反应一方固定在芯片上, 称为探针, 是经过 PCR 扩增或克隆或逆转录等后固定于芯片上。令一方则在标记后通过流路或加样在芯片上, 称为标记靶标。标记是在扩增或逆转录过程中进行。标记完毕, 游离标记物通过对标记产物的纯化除去, 否则影响显色背景。标记探针的使用量要根据芯片的实际大小进行调整。杂交反应过程中, 芯片要始终保持润湿状态^[50]。芯片杂交属于固-液杂交。影响异源杂交双链形成的因素包括靶标浓度、探针浓度、杂交双方的序列组成、盐浓度和温度

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库